https://doi.org/10.15407/cryo26.02.184

Вплив кріопротекторів і низьких температур на збереженість еритроцитів бика, коня та кролика

П.Ю. Улізко[1], О.М. Боброва[2]
[1]*Харківська державна зооветеринарна Академія, м. Харків*
[2]*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків*

Effect of Cryoprotectants and Low Temperatures on Survival of Bovine, Equine and Rabbit Erythrocytes

P.Yu. Ulizko[1], O.N. Bobrova[2]
[1]*Kharkov State Zooveterinary Academy, Kharkiv, Ukraine*
[2]*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine*

Видові відмінності еритроцитів різних тварин ускладнюють процедуру їх кріоконсервування. Різний склад мембран, будова та властивості гемоглобіну, вміст речовин у внутрішньоклітинному середовищі обумовлюють необхідність створення середовища кріоконсервування еритроцитів кожного виду тварин індивідуально. У даній роботі проведено підбір середовища кріоконсервування еритроцитів бика, коня та кролика. Під час підбору використовували кріозахисні сполуки, які ефективні при кріоконсервуванні еритроцитів людини: 1,2-пропандіол (1,2-ПД), диметилсульфоксид (ДМСО), поліетиленоксид із м. м. 1500 (ПЕО-1500), сахароза. Кріоконсервант додавали до відмитої еритромаси у об'ємному співвідношенні 1:1. Після 15 хв інкубації зразки у пластикових контейнерах об'ємом 1 мл охолоджували зануренням у рідкий азот (–196°С). Відігрівання здійснювали на водяній бані при 40°С до появи рідкої фази. Ефективність кріопротекторів у різній комбінації оцінювали за гемолізом, осмотичною крихкістю та моделюванням трансфузії еритроцитів після кріоконсервування. Вимірювання гемолізу проводили спектрофотометричним методом. Моделювали трансфузію за допомогою інкубування кріоконсервованих еритроцитів досліджуваних тварин при 37°С у плазмі або фізіологічному розчині протягом 24-х годин.

Концентрацію ПЕО-1500 у комбінованому середовищі варіювали в межах 5–20%, ДМСО – 5–15%, 1,2–ПД і сахарози – 5–10%. Виявлено, що комбінування проникних і непроникних кріозахисних сполук дозволяє отримати найменший рівень гемолізу. При цьому використання ПЕО-1500 у концентраціях 15 і 20% дозволило отримати найнижчий рівень гемолізу одразу після розморожування. Після відмивання від кріозахисного середовища з 20% ПЕО-1500 сумарний гемоліз сягав 41–43%. Зниження його концентрації до 15% дозволило зменшити рівень гемолізу під час заморожування-відтавання та відмивання від кріопротекторів до 23–25%. Оптимальна концентрація ДМСО – 10%. Використання інших концентрацій призводило до збільшення гемолізу на усіх етапах кріоконсервування. Підвищення концентрації 1,2-ПД і сахарози вище 5% виявилося недоцільним.

Таким чином, було підібрано комбінацію кріопротекторів, яка дозволила отримати найменший гемоліз після кріоконсервування еритроцитів бика, коня та кролика: 15% ПЕО-1500, 10% ДМСО, 5% 1,2-ПД, 5% сахарози. Інкубування та заморожування в підібраному середовищі не призводило до істотного погіршення осмотичних властивостей еритроцитів. Моделювання трансфузії показало, що протягом 24-х годин гемолізувало не більше 5,5% клітин у плазмі та 6,4% у фізіологічному розчині.

Species-specific differences of erythrocytes of various animals complicate the procedure of their cryopreservation. Different membrane composition, structure and properties of hemoglobin, the content of substances in intracellular medium stipulate the need in designing the medium for erythrocytes cryopreservation individually for each animal species. Present study was performed to select the cryopreservation media for bovine, equine and rabbit erythrocytes. For this purpose we used the cryoprotective compounds, being efficient for human erythrocyte cryopreservation such as: 1,2-propanediol (1,2-PD), dimethyl sulfoxide (DMSO), polyethylene oxide with molecular weight of 1500 (PEO-1500) and sucrose. A washed erythrocyte concentrate was mixed with a cryopreservative in 1:1 ratio. After 15 min incubation the samples in 1 ml plastic containers were cooled by immersion into liquid nitrogen (–196°C). Thawing was done in a water bath at 40°C up to liquid phase appearance. The efficiency of cryoprotectants in different combinations was assessed by hemolysis, osmotic fragility and by modelling erythrocyte transfusion after cryopreservation. Hemolysis was measured spectrophotometrically. Transfusion was simulated using the incubation of cryopreserved erythrocytes of the studied animals at 37°C either in plasma or physiological saline within 24 hrs.

The concentration of PEO-1500 and DMSO in a combined medium was ranged within 5–20 and 5–15%, respectively, that for 1,2-PD and sucrose was within 5–10%. The combination of penetrating and non-penetrating cryoprotective compounds was revealed to provide the lowest hemolysis rate. The use of PEO-1500 at 15 and 20% concentrations allowed thereby obtaining the lowest hemolysis immediately after freeze-thawing. After washing out the cryoprotective medium with 20% PEO-1500 the total hemolysis reached 41-43%. Reduction of its concentration down to 15% enabled decreasing the hemolysis level down to 23–25% during freeze-thawing and washing out the cryoprotectants. The optimal DMSO concentration was 10%. The use of other concentrations resulted in an increased hemolysis at all the stages of cryopreservation. The augmentation of 1,2-PD and sucrose concentration higher than 5% occurred to be inexpedient.

Thus, we selected the combination of cryoprotectants, which allowed obtaining the lowest hemolysis of bovine, equine and rabbit erythrocytes after cryopreservation: 15% PEO-1500, 10% DMSO, 5% 1,2-PD, 5% sucrose. The incubation and freezing in a selected medium did not result in a significant aggravation of osmotic properties of erythrocytes. The transfusion simulation resulted in the hemolysis of not more than 5.5% of cells in plasma and 6.4% in physiological saline within 24 hrs.